MYCOTOXINOGÉNÈSE DE SOUCHES DE *FUSARIUM*: CONTRAINTE EN VUE DE LEUR UTILISATION DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE

DUPUY Jacques, LE BARS Joseph et LE BARS Pierrette

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie INRA, 180 Chemin de Tournefeuille 31300 Toulouse.

RÉSUMÉ - Les souches de *Fusarium* dispersées dans l'environnement en vue de la lutte biologique peuvent contaminer secondairement des denrées alimentaires. Or, différentes mycotoxines peuvent être élaborées par de nombreuses espèces de ce genre. La toxinogenèse de 73 souches, isolées de différentes denrées alimentaires (céréales, fruits et légumes, ...) a été éprouvée *in vitro*. La fusarochromanone ne fut détectée dans aucune souche; la zéaralénone et le déoxynivalénol furent produits respectivement par 59 et 12,3 % des isolats; malgré une fréquence significative (14 %), le risque potentiel de contamination par les trichothécènes dermonécrosants apparaît faible. Dans les cultures de 2 souches sélectionnées pour la lutte biologique, aucune des mycotoxines recherchées ne fut détectée. Une telle vérification de la non-toxigénicité des souches fait intégralement partie de la domestication des Micromycètes.

ABSTRACT - The spreading of *Fusarium* in the environment, for the biological control, can lead to a secondary contamination of the foodstuffs. Furthermore, many species of the genus *Fusarium* can elaborate different mycotoxins. The toxinogenesis of 73 strains, isolated from various foodstuffs (cereals, fruits and vegetables, ...) has been tested *in vitro*. Fusarochromanone wasn't detected in any strains; zearalenone and deoxynivalenol were produced respectively by 59 and 12,3 % of the isolates; despite a significative frequency (14 %), the potentiel hazard of contamination with the skin necrotizing trichothecenes appears low. In the cultures of 2 strains selected for the biological control, none of those mycotoxins were detected. This checking study concerning the non-toxigenicity of strains is a required step to allow the domestication of Micromycetes.

MOTS CLÉS : *Fusarium*, mycotoxines, lutte biologique.

INTRODUCTION

Parmi les différentes utilisations des Micromycètes se développant actuellement, des expérimentations basées sur l'emploi de souches de *Fusarium* non pathogènes permettent d'envisager ce procédé comme moyen de lutte biologique contre les fusarioses des cultures maraîchères et florales (Alabouvette et al., 1987).

Avant de disperser de telles souches dans l'environnement, il convient de s'assurer non seulement qu'elles ne sont pas pathogènes pour l'homme ou les animaux mais aussi qu'elles soient atoxinogènes sur les denrées alimentaires, notamment les céréales (Le Bars, 1982), qu'elles peuvent contaminer dans un second temps. En effet, les espèces du genre *Fusarium*, largement réparties sur

tout le globe, sont connues pour leur capacité à infecter les produits agricoles en particulier les grains (Nelson et al., 1981; Booth, 1984). La plupart des espèces de *Fusarium* ont été rapportées comme productrices de mycotoxines (Marasas et al., 1984; Chelkowsky, 1989), principalement la zéaralénone (Mirocha et al., 1971; Di Menna et al., 1987), les trichothécènes non macrocycliques (Pathre & Mirocha, 1979; Ueno, 1983; Snyder, 1986; Grove, 1988) et plus récemment la fusarochromanone (Pathre et al., 1986). Plusieurs autres toxines ont été caractérisées dans le genre *Fusarium* (Vesonder & Golinski, 1989).

Afin de limiter de tels risques dans la perspective du développement de l'emploi de souches de *Fusarium* pour la lutte biologique, il a été recommandé par la Commission Nationale de Toxicologie que la non toxinogénicité de ces souches soit examinée.

Pour effectuer le choix des toxines à rechercher, nous avons tenu compte tout d'abord des principales voies de biosynthèse des mycotoxines (Steyn, 1980) reconnues comme contaminants naturels dans différentes régions du monde, notamment en Europe (Gareis et al., 1989); d'autre part, il convenait de prendre en compte la mycotoxinogénèse effective des souches de *Fusarium* isolées de grains de nos principales céréales.

En conséquence, après avoir mis au point un protocole expérimental prenant en compte la diversité des conditions optimales de toxinogénèse *in vitro* et des méthodes d'analyse, nous avons examiné l'aptitude de l'ensemble de ces souches, "domestiquées" et "sauvages", à produire les mycotoxines retenues: zéaralénone, fusarochromanone, déoxynivalénol et trichothécènes dermonécrosants.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Aspects mycologiques

Les souches de *Fusarium* (n = 73) provenaient de blé (38), maïs (13), tubercules (6), fruits et légumes (5), sol (2)... La plupart nous furent données par l'Institut Technique des Céréales et Fourrages (Baziège, Hte Garonne) et l'Unité de Phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain; les autres furent isolées de maïs au laboratoire.

Les deux souches destinées à la lutte biologique étaient issues de travaux effectués à l'Institut National de Recherche Agronomique (Alabouvette et al., 1987) et développées par une entreprise.

B. Epreuve de toxinogénèse

D'après l'ensemble des données bibliographiques (Eugenio et al., 1970; Greenhalgh et al., 1983; Xie et al., 1989) ainsi que des essais préalablement effectués dans notre laboratoire sur la zéaralénone (Z), la fusarochromanone (F), le déoxynivalénol (D) et les trichothécènes dermonécrosants (TD), les conditions optimales retenues pour l'épreuve de toxinogénèse furent les suivantes:

- milieu solide granulaire: 30 g de riz (Uncle Ben's) autoclavé (120°C, 10 mn), teneur en eau = 50%, en erlenmeyers de 100 ml;

- 4 semaines d'incubation: 2 semaines à 28°C suivies d'1 semaine à 20°C et enfin 1 semaine à 12°C. Cette séquence de température favorisant respectivement la production de (D), (F) et (Z) enfin des (TD). Deux séries

d'erlenmeyers furent ensemencées pour tenir compte des 2 techniques d'extraction.

C. Techniques analytiques

Extraction: macération à 20°C pendant 48 heures avec 50 ml de l'un des mélanges:

- méthanol - eau - ammoniaque (MeOH - H_2O - NH_4OH) (90: 10: 2, → E1;

- acétonitrile - eau (C_2H_3N - H_2O) (90: 10) → E2.

Purification:

1. Partition liquide - liquide:

• pour la (F): (a) 14 ml F_1 additionné de 11 ml H_2O (→ MeOH 50%),
(b) délipidation par l'isooctane (2 x 15 ml),
partition contre le chloroforme ($CHCl_3$): 25 puis 10 ml,
(c) déshydratation de la phase $CHCl_3$ (filtre séparateur de phase Whatman),
(d) concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif, reprise quantitative par $CHCl_3$, évaporation à sec sous azote (N_2),
(e) reprise finale par 100μl $CHCl_3$ - C_2H_3N (80: 20).

• pour les (TD): (a) 25 ml E_2,
(b) addition de 10 ml H_2O à 5% KCl avant délipidation,
(c) déshydratation par Na_2SO_4 anhydre,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 125μl acétone.

2. Chromatographie d'absorption sur minicolonnes (Trucksess et al., 1984 modifiée par Eppley et al., 1986):

• pour le (D): (a) 20 ml E_2,
(b) colonne conditionnée par 10 ml C_2H_3N - H_2O (90: 10), débit = 2 ml/mn, puis élution par 10 ml C_2H_3N - H_2O (90: 10),
(c) déshydratation par partition contre 30 ml $CHCl_3$ puis passage sur filtre séparateur de phase,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 100 ml $CHCl_3$ - C_2H_3N (80: 20).

• pour la (Z): colonne précédente amenée à sec puis,
(b) élution par 40 ml $CHCl_3$ - C_2H_5OH (95: 5),
(d) déshydratation par passage sur filtre séparateur de phase,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 100μl C_6H_6 - C_2H_3N (90: 10).

La séparation et la quantification furent réalisées par Chromatographie Planaire Instrumentalisée sauf pour les (TD), révélés par leur activité dermonécrosante sur l'animal.

Les dépôts (5μl) furent effectués sur des plaques de gel de silice 60 (20 x 20 Merck, n° 5553) à l'aide de micropipettes à usage unique (Microcaps, Drummond). Du fait de la diversité des toxines recherchées et des métabolites

fongiques pouvant interférer lors du dosage, nous avons eu recours à des techniques de Chromatographie Planaire Multiséquentielle pour la séparation.

1. Migration Double Unidimensionnelle:

Phase éluante 1: toluène - acétate d'éthyle - acide formique (TEF) (60: 30: 10) pour la (F) et la (Z), à front perdu, puis séchage et développement dans le même sens dans la phase éluante 2.

Phase éluante 2: butanol - acide acétique -eau (80: 20: 20) pour la (F) ou chloroforme - éthanol (95: 5) pour la (Z).

2. Migration Double Antidirectionnelle: pour le (D)

Les dépôts sont effectués à mi-hauteur de la plaque, puis soumis à un développement dans la phase éluante 1 à front perdu. Après séchage et coupure à 2cm au-dessus du Rf de la toxine, la plaque est retournée (180°) et placée dans le mélange suivant: $CHCl_3$ - MeOH (90: 10) pour la séparation finale.

La quantification fut effectuée par spectrofluorodensitométrie (Shimadzu CS 930) après avoir déterminé la longueur d'onde maximale (λ max) d'excitation en fluorescence sans dérivation postchromatographique pour la (F) ou après dérivation pour le (D) par pulvérisation de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 20% suivi d'un chauffage à 110° pendant 10 mn (Kamimura et al., 1981). Pour la (Z), la λ max d'absorption après application de benzidine (Malaiyandi et al., 1976) par pulvérisation fut déterminée.

Seuls les (TD) furent détectés par la voie biologique: 5μl d'extrait purifié et concentré (E_2 - TD - e) furent déposés sur la peau d'une jeune ratte (100 - 150g). Les éventuelles lésions basées sur l'action irritante et nécrosante des trichothécènes sont observées au 3ème et 5ème jour (Le Bars & Le Bars, 1991).

RÉSULTATS

1. Méthode analytique

L'ensemble des techniques retenues (mélange de solvants, séquences de développement, ...) ont permis la séparation des différentes mycotoxines recherchées; cette dernière fut validée, pour chaque plaque, par la méthode des ajouts. Les performances quantitatives de ces techniques sont résumées dans le tableau 1.

2. Distribution du potentiel toxinogène

La fusarochromanone ne fut détectée dans aucune des cultures. En ce qui concerne les autres mycotoxines, la fréquence des souches productrices est rapportée dans le tableau 2.

Aucune des mycotoxines envisagées dans cette étude n'a pu être mise en évidence dans les 2 souches sélectionnées pour la lutte biologique.

En ce qui concerne les autres souches, isolées de différentes denrées, la zéaralénone, le déoxynivalénol et les autres trichothécènes (TD) ont été détectés. Certaines souches peuvent élaborer simultanément plusieurs toxines. Pour une toxine donnée, l'intensité de la production est très variable en fonction des souches. La distribution du potentiel toxinogène, pour la zéaralénone et le déoxynivalénol, est représentée dans les figures 1 et 2 après constitution de classes selon une échelle logarithmique (Le Bars & Le Bars, 1991). Les productions

	fusarochromanone	déoxynivalénol	zéaralénone
longueur d'onde maximale . d'excitation pour la fluorescence (λ max. fluorescence) . d'absorption (λ max. absorption)	385 nm	330 nm après pulvérisaton d'$AlCl_3$ 20%	500 nm après pulvérisaton de benzidine
seuil de détection (detection limit)	0,1 ng	10 ng	25 ng
zone de linéarité de la réponse (relation quantité-aire) (response linearity)	0,1 à 6 ng	10 à 190 ng	25 à 500 ng
taux de recouvrement après contamination volontaire (recovery rate)	90 à 95%	83 à 91%	76 à 112%
limite de quantification (mg/kg = ppm) (quantification limit)	0.005	0,25	0,075

Tableau 1 : Performances des techniques analytiques utilisées pour le dosage des mycotoxines en Chromatographie Planaire Instrumentalisée.

Table 1: Performances of the analytical methods used for the mycotoxins quantification by Instrumental Thin Layer Chromatography.

maximales furent respectivement 14500 et 100μg/g pour la zéaralénone et le déoxynivalénol.

Les extraits de 10 souches présentèrent une irritation significative sur la peau des animaux, mais sans provoquer une nécrose nette et durable; c'est à dire que les concentrations estimées en unités dermonécrosantes (Le Bars & Le Bars, 1991) correspondaient à des concentrations inférieures à 0,2 ppm en équivalent dermonécrosant de la toxine T2.

DISCUSSION

La fusarochromanone provoque des malformations osseuses, la dyschondroplasie tibiale (Lee et al., 1985), et est fortement suspectée de pouvoir tératogène. Le test de toxinogénèse mis en oeuvre a été validé grâce à la culture d'une souche productrice[1]. La technique de dosage mise au point présente un

[1] Aimablement fourni par MIROCHA C.J., Université de St Paul, Minnesota, U.S.A.

Espèces	Z	D	TD	Z+D	Z+D+TD
F. graminearum	(26/31) 84	(4/31) 13	(3/31) 9,7	(2/31) 6,5	(2/31) 6,5
F. culmorum	(14/22) 63,6	(4/22) 18	(6/22) 27	(1/22) 4,5	(2/22) 9
Autres *F. roseum*	(3/20) 15	(1/20) 5	(1/20) 5	(0/20) ND	(0/20) ND
Ensemble	(43/73) 59	(9/73) 12,3	(10/73) 13,7	(3/73) 4,1	(4/73) 5,5

Tableau 2 : Fréquence de souches de *Fusarium* élaborant une ou plusieurs mycotoxines (Z = zéaralénone; D = déoxynivalénol; TD = trichothécènes dermonécrosants). () : nombre de souches productrices sur le nombre de souches examinées.

Table 2: Frequency of *Fusarium* strains producing one or several mycotoxins [Z = zearalenone; D = deoxynivalenol; TD = skin-necrotizing trichothecenes). () : number of the toxinogenic strains on the number of studied strains.

taux de recouvrement supérieur et un seuil de détection équivalent à ceux rapportés par Krogh et al. en 1989; quant à la limite de quantification, elle est comparable à celle obtenue par Yu & Chu en 1991 lors du dosage par immunochromatographie. Sous réserve de la représentativité des souches examinées, il s'avère que cette toxine ne devrait pas constituer un problème aigu en France. Ces observations corroborent les travaux de Wu et al. (1990); en effet, sur 62 souches de *Fusarium* représentant 9 espèces de différentes régions du monde, seulement 3 isolats de *F. equiseti* se sont avérés producteurs de fusarochromanone.

La zéaralénone provoque chez les animaux et principalement le porc, une perturbation de la fonction de reproduction. La technique analytique mise en oeuvre permet d'atteindre une limite de quantification équivalente à celle recommandée l'AFNOR et l'ISO (International Standard Organization) (Anonyme, 1986), tout en s'affranchissant de l'emploi de la Chromatographie Bidimensionnelle et permettant ainsi la séparation et le dosage de plusieurs extraits sur la même plaque. La fréquence des souches toxinogènes pour la zéaralénone dans les espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*, les plus fréquemment isolées à partir de céréales est importante (59%), elle est équivalente à celle résultant d'une étude similaire (60%) effectuée en 1978 (Le Bars, 1982). On peut considérer que le tiers des souches, ayant produit plus de 250 µg g dans ces conditions expérimentales, peut conduire à une contamination naturelle de céréales si les conditions de conservation permettent leur développement.

Le déoxynivalénol, prénommé antérieurement "facteur de refus" ou "vomitoxine" perturbe principalement la fonction digestive. Les modifications apportées (traitement de l'extrait après élution) à la technique de dosage du déoxynivalénol (Eppley et al., 1986; Romer, 1986) ont permis une plus grande

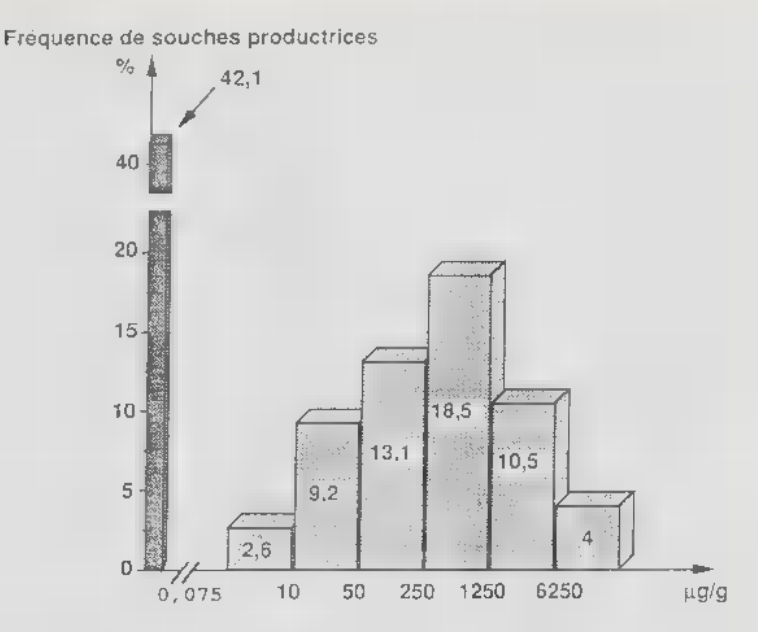


Figure 1 : Répartition du potentiel toxinogène des souches de *Fusarium* pour la zéaralénone.

Figure 1: Toxinogenic strength distribution of *Fusarium* strains for zearalenone.

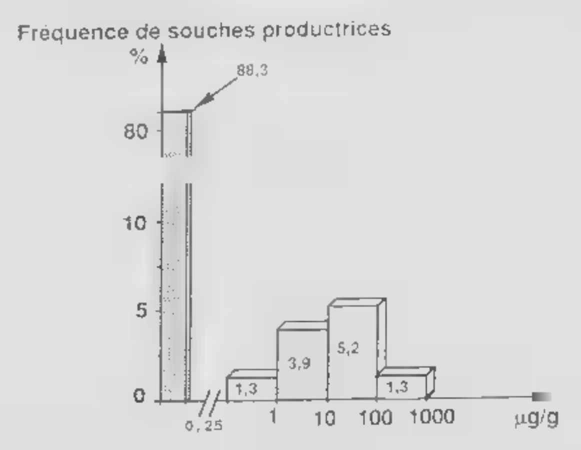


Figure 2 : Répartition du potentiel toxinogène des souches de *Fusarium* pour le déoxynivalénol.

Figure 1: Toxigenic strength distribution of *Fusarium* strains for deoxynivalenol.

souplesse d'utilisation tout en conservant un taux de recouvrement et une limite de quantification équivalents. Le dosage du déoxynivalénol et de la zéaralénone à partir d'un même extrait s'inscrit dans une démarche de multidétection, d'autant plus que ces 2 mycotoxines sont souvent associées en tant que contaminant naturel (Jemmali et al., 1978; Mirocha et al., 1976; Tanaka et al., 1988). Parmi

les souches productrices, seulement 6,5‰ peuvent être considérées comme présentant un risque réel. Cette fréquence est analogue à celle rapportée par Ramakrishna et al. (1989) dans leur étude sur 322 souches isolées de blé en Inde.

La détection et la quantification des trichothécènes par des méthodes physico-chimiques demeurant laborieuses (Gilbert, 1984; Scott, 1982; Scott & Kanhere, 1986), une estimation semi-quantitative par le test de l'irritation cutanée est validée par la relation dose-réponse entre la quantité de trichothécènes et l'intensité des lésions sur la peau de l'animal (Chung et al., 1974; Fairhurst et al., 1987; Hayes & Schiefer, 1979). En conséquence, cette technique biologique permet de répondre à l'objectif fixé. Malgré une fréquence non négligeable (14‰) de souches productrices d'une ou plusieurs molécules de cette famille, le risque de contamination des denrées à l'état naturel doit être très limité compte tenu des faibles concentrations obtenues dans des conditions optimales de toxinogénèse.

Les principales toxines recherchées peuvent être élaborées par des souches appartenant à différentes espèces, ce qui est en accord avec les travaux rapportés par Thrane (1989), il en résulte que la relation espèce-toxine est, comme dans le genre *Penicillium*, moins étroite que celle entre l'*Aspergillus flavus* et les aflatoxines par exemple. En conséquence, la vérification de la non-toxinogénicité d'une souche de *Fusarium* doit prendre en compte les principales fusariotoxines, indépendamment de l'espèce.

Il apparaît logique que, pour des raisons de qualité et de sécurité alimentaires, des souches fongiques mycotoxinogènes ne soient pas dispersées volontairement dans l'environnement. Mais cette disposition n'est pas prévue dans le classement des microorganismes proposé par l'European Federation of Biotechnology (Anonyme, 1985); cette liste provisoire et évolutive présente seulement "les espèces microbienne communément reconnues comme pathogènes pour l'Homme" (AFNOR, 1990).

D'autre part, ce type d'utilisation (lutte biologique) de microorganismes ne rentre pas non plus dans la classification de l'US - FDA concernant les biotechnologies et les substances "généralement reconnues comme saines" (GRAS: "generally recognized as safe") (Mc Namara, 1987; Gibbs & Kahan, 1986).

En conséquence, il devient urgent que les experts toxicologues s'accordent sur une stratégie, une méthodologie et des dispositions raisonnables, spécifiques à l'utilisation de souches fongiques pour la lutte biologique. En effet, autant est-il logique de ne pas disperser dans l'environnement des souches fortement productrices de mycotoxines connues, autant une trop grande prudence condamnerait-elle toute innovation constituant une alternative à l'utilisation de pesticides de synthèse, fortement combattue par ailleurs.

RÉFÉRENCES

AFNOR, 1990 - Liste des espèces microbiennes communément reconnues comme pathogènes pour l'Homme. Norme X 42-040, 10 p.

ALABOUVETTE C., de la BROISE D., LEMANCEAU P., COUTEAUDIER Y. et LOUVET J., 1987 - Utilisation de souches non pathogènes de *Fusarium* pour lutter contre les fusarioses: situation actuelle dans la pratique. Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin 17: 665-674.

Anonyme, 1985 - European Federation of Biotechnologies - Safe biotechnology, general considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 1-6.

Anonyme, 1986 - AFNOR: Aliments des animaux. Dosage de la zéaralénone. NF V 18-201. 6p.

BOOTH C., 1984 - The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. *In:* M.O. MOSS & J.E. SMITH, *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press: 1-13.

CHELKOWSKY J., 1989 - *Fusarium. Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity.* Amsterdam, Elsevier Sc. Publ. 492 p.

CHUNG C.W., TRUCKSESS M.W., GILES A.L. and FRIEDMAN L., 1974 - Rabbit skin for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 57: 1121-1127.

Di MENNA M.E., LAUREN D.R., POOLE P.R., MORTIMER P.H., HILL R.A. and AGNEW M.P., 1987 - Zearalenone in New-Zealand pasture herbage and the mycotoxin-producing potential of *Fusarium* species from pasture. *New Zealand J. Agric. Res.* 30: 499-504.

EPPLEY R.M., TRUCKSESS M.W., NESHEIM S., THORPE C.W. and POHLAND A.E., 1986 - Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat: collaborative study. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 69: 37-40.

EUGENIO P.C., CHRISTENSEN C.M. and MIROCHA C.J., 1970 - Factors affecting producing of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. *Phytopathology* 60: 1055-1057.

FAIRHURST S., MAXWELL S.A., SCAWIN J.W. and SWANSTON D.W., 1987 - Skin effect of trichotecens and their amelioration by decontamination. *Toxicology* 46: 307-319.

GAREIS M., BAUER J., ENDERS C. and GEDEK B., 1989 - Contamination of cereals and feeds with *Fusarium* mycotoxins in European countries. *In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity.* Amsterdam, Elsevier Sc. Publ.: 441-472.

GIBBS J.N. and KAHAN J.S., 1986 - Biotechnology and the food industry: leaping the regulatory hurdles. *Biotechnology* 4: 199-205.

GILBERT J., 1984 - The detection and analysis of *Fusarium* mycotoxins. *In:* M.O. MOSS & J.E. SMITH, *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press: 175-193.

GREENHALGH R., NEISH G.A. and MILLER J.D., 1983 - Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolate of *Fusarium graminearum* on solid subtrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 625-629.

GROVE J.F., 1988 - Non-macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 5: 187-209.

HAYES M.A. and SCHIEFER H.B., 1979 - Quantitative and morphological aspects of cutaneous irritation by trichothecenes mycotoxins. *Food Cosmet. Toxicol.* 17: 611-621.

JEMMALI M., UENO Y., ISHII K., FRAYSSINET C. and ETIENNE M., 1978 - Natural occurrence of trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, T-2) and zearalenone in corn. *Experientia* 34: 1333.

KAMIMURA H., NISHIJIMA M., YASUDA K., SAITO K., IBE A., NAGAYAMA T., USHIYAMA H. and NAOI Y., 1981 - Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereal grains, and foodstuffs. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 64: 1067-1073.

KROGH P., CHRISTENSEN D.H., HALD B., HARLOU B., LARSEN C., PEDERSEN E.J. and THRANE U., 1989 - Natural occurrence of the mycotoxin fusarochromanone, a metabolite of *Fusarium equiseti*, in cereal feed associated with tibial dyschondroplasia. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3184-3188.

LE BARS J. and LE BARS P., 1991 - Toxinogenesis and development conditions of *Stachybotrys atra* in France. *Acta Vet. Scand.* 87: 349-351.

LE BARS J., 1982 - Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grains-microorganismes. *In:* J.L. MULTON, *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés.* Paris, Lavoisier, Techniques et documentation 1: 376-393.

LEE Y.W., MIROCHA C.J., SHROEDER D.J. and WALSER M.M., 1985 - TDP - 1, a toxic component causing tibial dyschondroplasia in broiler chickens, and trichothecenes from *Fusarium roseum* "*Graminearum*". *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 102-107.

MALAIYANDI M., BARETTE J.P. and WAVROCK P.L., 1976 - Bis diazotized benzidine as a spray reagent for detecting zearalenone on thin-layer chromoplates. *J. Assoc. Analytical Chem.* 59: 959-962.

MARASAS W.F.O., NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., 1984 - *Toxigenic Fusarium species. Identity and Mycotoxicology.* The Pennsylvania State University Press.

Mc NAMARA S.H., 1987 - FDA regulation of food substances produced by new techniques of biotechnology. *Food Drug Law J.* 42: 50-64.

MIROCHA C.J., CHRISTENSEN C.M. and NELSON G.H., 1971 - F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium. In:* S. KADIS, A. CIEGLER & S.J. AJL, *Microbiol. Toxins.* New York, Academic Press, VII: 107-138.

MIROCHA C.J., PATHRE S.V., SCHAUERHAMER B. and CHRISTENSEN C.M., 1976 - Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 553-556.

NELSON P.E., TOUSSOUN T.A. and COOK R.J., 1981 - *Fusarium. Diseases, Biology, and Taxonomy.* The Pennsylvania State University Press: 3-221.

PATHRE S.V. and MIROCHA C.J., 1979 - Natural occurrence and potential hazard. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56: 820-823.

PATHRE S.V., GLEASON W.B., LEE Y.W. and MIROCHA C.J., 1986 - The structure of fusarochromanone: new mycotoxin from *Fusarium roseum.* "*Graminearum*". *Canad. J. Chem.* 64: 1308-1311.

RAMAKRISHNA Y., BHATAND R.V. and RAVINDRANATH V., 1989 - Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2619-2620.

ROMER T.R., 1986 - Use of small charcoal / alumina cleanup colums in determination of trichothecenes mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 69: 699-703.

SCOTT P.M. and KANHERE S.R., 1986 - Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 368: 374-380.

SCOTT P.M., 1982 - Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 65: 876-883.

SNYDER A.P., 1986 - Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. *J. Food Prot.* 49: 544-569.

STEYN P.S., 1980 - *The Biosynthesis of Mycotoxins, a Study in Secondary Metabolism.* New York, Academic Press, 432 p.

TANAKA T., HASEGAWA A., YAMAMOTO S., LEE U.S., SUGIURA Y. and UENO Y., 1988. - Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36: 979-983.

THRANE U., 1989 - *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. *In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Sci. Publ.: 199-225.

TRUCKSESS M.W., NESHEIM S. and EPPLEY R.M., 1984 - Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 67: 40-43.

UENO Y., 1983 - *Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Amsterdam, Elsevier Sci. Publ., 4: 313 p.

VESONDER R.F. and GOLINSKI P., 1989 - Metabolites of *Fusarium*. *In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Sci. Publ.: 13-31.

WU W., NELSON P.E., COOK M.E. and SMALLEY E.B., 1990 - Fusarochromanone production by *Fusarium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2989-2993.

XIE W., MIROCHA C.J., PAWLOSKY R.J., WEN Y. and XU X., 1989 - Biosynthesis of fusarochromanone and its monoacetyl derivative by *Fusarium equiseti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 794-797.

YU J. and CHU F.S., 1991 - Immunochromatography of fusarochromanone mycotoxins. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 74: 655-660.